



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12P 1/04, C07G 17/00, A61K 35/74, 39/04, 38/46 // (C12P 1/04, C12R 1:32)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 95/20673</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 3 août 1995 (03.08.95)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR95/00092 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 26 janvier 1995 (26.01.95) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 94/01170 28 janvier 1994 (28.01.94) FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BONNEVILLE, Marc [FR/FR]; 15, rue de l'Oliveraie, F-44200 Nantes (FR). CONSTANT, Patricia, Marie-Claude [FR/FR]; 20, rue de Castanet, F-31400 Toulouse (FR). FOURNIE, Jean-Jacques [FR/FR]; Rue Jeanne-Dieulafoy, F-31450 Pompertuzat (FR). PUZO, Germain [FR/FR]; 2, impasse Goudouli, Auzeville-Tolosane, F-31320 Castanet (FR). <b>(74) Mandataire:</b> BARRE, Philippe; Cabinet Barre Laforgue & Associés, 95, rue des Amidonniers, F-31000 Toulouse (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> ORGANO-PHOSPHORUS COMPOUNDS AS ACTIVATORS OF GAMMA DELTA T CELLS <b>(54) Titre:</b> COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ACTIVATEURS DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA <b>(57) Abstract</b> <p>Non-peptide hydrosoluble organo-phosphorus containing compound for use as a human T<sub>9942</sub> cell activator, comprising at least one acidolabile ester bond of phosphoric acid. The activating properties of said compound in relation to lymphocytes are lost when it is placed in the presence of an enzymatic mixture comprising at least one phosphoric phosphohydrolase monoester and at least one phosphoric phosphohydrolase diester. The invention also concerns a method for the preparation, isolation or characterization of such a compound and compositions and pharmaceutical uses thereof.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne un composé organo-phosphoré hydrosoluble de nature non-peptidique, activateur des lymphocytes T<sub>9942</sub> humains, comprenant au moins une liaison ester acidolabile de l'acide phosphorique, le caractère activateur de ce composé vis-à-vis des lymphocytes disparaissant lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une diester phosphorique phosphohydrolase. L'invention concerne aussi un procédé pour préparer et/ou isoler et/ou caractériser un tel composé et des compositions et utilisations pharmaceutiques.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ACTIVEURS DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA

5 L'invention concerne des composés organo-phosphorés hydrosolubles non-peptidiques stimulant des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains. L'invention concerne aussi un procédé pour préparer et/ou isoler et/ou caractériser de tels composés organo-phosphorés, une composition  
10 pharmaceutique, notamment vaccinante comportant au moins un tel composé organo-phosphoré, diverses utilisations de ces composés pour obtenir des compositions pharmaceutiques, une composition pharmaceutique inhibant l'activité de ces composés sur les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  et les utilisations de  
15 cette composition pour obtenir des médicaments.

On sait déjà que les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables  $V_{\gamma}$  et  $V_{\delta}$  (lymphocytes  $CD3+$ , TCR  $\alpha\beta-$ ,  $CD4-$ ,  $CD8-$ ) jouent un rôle dans le système immunitaire de l'homme et de l'animal.  
20 Par exemple, leur présence a été démontrée dans le cadre de diverses maladies telles que les infections bactériennes, notamment mycobactériennes (en particulier la tuberculose et la lèpre) ou à streptocoques, les affections tumorales ou leucémiques, certains parasites (par exemple le  
25 *Plasmodium*), le SIDA et les maladies auto-immunes (sclérose en plaques, lupus, ...).

On sait aussi que dans le sang périphérique de l'adulte, les lymphocytes T porteurs de TCR à régions variables  $V_{\gamma 9}$   $V_{\delta 2}$  (lymphocytes  $T_{\gamma 9\delta 2}$ ) représentent la  
30 majorité (de l'ordre de 80 %) des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ .

On cherche ainsi depuis la découverte des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  à comprendre le mécanisme de leur activation et leurs fonctions physiologiques.

Certains auteurs ont pensé que les  
35 lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  répondent à un antigène formé d'une protéine telle que HSP60. D'autres auteurs ont cependant contredit cette thèse. Néanmoins, il n'a pas encore été possible d'isoler un antigène des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ .

Il a été aussi démontré que les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  reconnaissent et lysent les cellules cancéreuses et les cellules infectées, notamment par les mycobactéries, et s'accumulent sur certains sites infectieux.

5 Or, les affections sus-mentionnées dans lesquelles les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  interviennent sont pour la plupart considérées à ce jour comme particulièrement sévères. En conséquence, depuis la découverte des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ , on cherche à mettre en évidence le (les)  
10 antigène(s) susceptible(s) de les activer et à expliquer la raison de leur présence en grand nombre dans le sang périphérique de l'adulte.

Par ailleurs, dans certains cas, les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  agissent comme des agents pathogènes qu'il  
15 serait souhaitable de pouvoir inhiber. Tel est le cas en particulier dans le cadre des maladies auto-immunes, telles que la sclérose en plaques.

L'invention vise donc, de façon générale, à proposer des moyens pour contrôler la prolifération et/ou  
20 l'activité cytotoxique des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ , notamment des lymphocytes  $T_{\gamma\delta 2}$  humains, que ce soit pour les stimuler en vue de favoriser leur rôle immunitaire, ou pour les inhiber lorsqu'ils sont impliqués dans une pathologie, notamment auto-immune.

25 Ainsi, l'invention vise à proposer des composés isolés activateurs des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ , notamment des lymphocytes  $T_{\gamma\delta 2}$ , leur procédé de préparation, leur utilisation dans une composition pharmaceutique, notamment vaccinnante, et leurs diverses utilisations thérapeutiques  
30 pour le traitement préventif ou curatif de l'homme ou de l'animal.

L'invention vise en particulier à proposer un procédé et une composition pour stimuler la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ . Et l'invention  
35 vise à proposer une utilisation de ce procédé ou de cette composition dans le traitement préventif (vaccin) ou curatif (immunomodulateur) : des maladies infectieuses à germes procaryotes ou eucaryotes -notamment

mycobactériennes, à streptocoques ou à plasmodium- ; et/ou des pathologies tumorales ou leucémiques ; et/ou des pathologies d'immunodéficiences telles que le SIDA.

L'invention vise également à proposer un  
5 procédé pour isoler et/ou caractériser des composés activant les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ , notamment des lymphocytes  $T_{\gamma\delta 2}$  humains.

L'invention vise en outre à proposer une composition destinée à inactiver les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ , et  
10 plus particulièrement une composition thérapeutique inactivant la cytotoxicité des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  impliqués dans des pathologies auto-immunes telles que la sclérose en plaques.

Pour ce faire, l'invention concerne un  
15 composé organo-phosphoré hydrosoluble de nature non-peptidique, activateur des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables  $V_{\gamma 9}$  et  $V_{\delta 2}$ , ce composé comprenant au moins une liaison ester acidolabile de l'acide phosphorique, le caractère  
20 activateur de ce composé vis-à-vis des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  disparaissant lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une diester phosphorique phosphohydrolase. Selon l'invention, le mélange enzymatique  
25 peut comprendre une pyrophosphohydrolase à titre de diester phosphorique phosphohydrolase.

Un composé selon l'invention présente un caractère anionique mesuré par chromatographie HPAEC à détection conductimétrique en mode de suppression chimique  
30 qui est supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate. Egalement, l'invention concerne un composé caractérisé en ce que, après traitement par une enzyme diester phosphorique phosphohydrolase, il présente un caractère  
35 anionique mesuré par chromatographie HPAEC à détection conductimétrique en mode de suppression chimique qui est supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate. En effet,

l'invention comprend les composés phosphodiester X-Phosphate-R dont la dégradation par l'enzyme diesterase libère le principe actif minimum X-Phosphate.

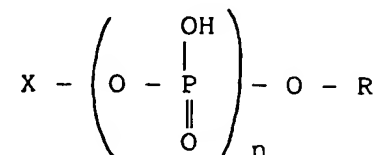
Egalement, l'invention concerne un composé  
 5 qui présente un caractère hydrophobe mesuré par chromatographie HPLC sur phase inverse de type C18 élue en paire d'ions avec l'acétate d'ammonium qui est inférieur à celui de la thymidine 5' monophosphate. Plus particulièrement, un composé selon l'invention est  
 10 caractérisé en ce que son activation sur les lymphocytes T<sub>γ</sub>6 est inhibée en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques des TCR humains comprenant les régions variables V<sub>γ</sub>9 ou V<sub>δ</sub>2.

Un composé selon l'invention comprend au  
 15 moins un substituant X de masse moléculaire inférieure à 500, qui est distinct d'un acide nucléique, d'un oligosaccharide, d'un acide gras (c'est-à-dire un acide carboxylique saturé comprenant au moins quatre carbones), d'un protide, d'un alcaloïde et d'un stéroïde, et qui est  
 20 lié dans le composé à un groupement phosphoryle par une liaison covalente acidolabile susceptible d'être clivée en présence d'une monoester phosphatase. En effet, il apparaît que la présence de la séquence X-Phosphate suffit pour conférer un pouvoir antigénique au composé selon  
 25 l'invention à l'égard des lymphocytes T<sub>γ</sub>6.

Par ailleurs, au moins un des composés organo-phosphorés selon l'invention comporte au moins un groupement nucléotidique. En particulier, l'invention concerne un composé répondant à la formule X-Phosphate-R où  
 30 R est un hydrogène ou un substituant minéral ou organique, notamment un groupement nucléosidique, et X est un substituant tel que mentionné ci-dessus.

En particulier, l'invention concerne un composé répondant à la formule :

35



40

où :

R est un hydrogène ou un substituant minéral ou organique,  
n est un nombre entier non nul.

L'invention concerne aussi un composé  
5 constitué d'un produit d'hydrolyse obtenu à partir d'un  
composé selon l'invention qui comprend la thymidine liée à  
un groupement phosphoryle par le cinquième carbone de son  
radical 2-désoxyribose, cette hydrolyse pouvant notamment  
être obtenue par l'action enzymatique d'une nucléotide  
10 pyrophosphatase et/ou d'une diester phosphorique  
phosphohydrolase.

Egalement, l'invention concerne un composé  
constitué d'un monoester phosphorique acidolabile de masse  
moléculaire inférieure à 500 distinct de la thymidine 5'  
15 monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la  
thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5'  
triphosphate.

Egalement, l'invention concerne un composé  
constitué d'un diester phosphorique acidolabile de masse  
20 moléculaire inférieure à 1 000, distinct de la thymidine 5'  
monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la  
thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5'  
triphosphate.

Un composé selon l'invention constitue un  
25 antigène isolé des lymphocytes T<sub>γ6</sub> humains, notamment des  
lymphocytes T à récepteurs TCR comprenant les régions  
variables V<sub>γ9</sub> et V<sub>δ2</sub>, et peut être utilisé en tant que tel.

Il est à noter que contrairement au préjugé  
général de l'art antérieur, et de façon surprenante, un  
30 antigène selon l'invention n'est pas peptidique. Il n'est  
pas non plus constitué d'une protéine telle que hsp60 ou  
hsp65, ni d'un peptide en dérivant. C'est pourquoi, les  
procédés traditionnels mis en oeuvre dans l'art antérieur  
pour isoler ces antigènes à partir d'une solution  
35 antigénique, et qui supposent que les antigènes sont de  
nature protéique, ont échoué.

L'invention concerne aussi une composition  
pharmaceutique, et plus particulièrement une composition

vaccinante comprenant au moins un composé organo-phosphoré selon l'invention.

Et l'invention concerne l'utilisation d'au moins un composé organo-phosphoré selon l'invention pour le  
5 traitement préventif ou curatif des maladies infectieuses bactériennes, notamment mycobactériennes comme la lèpre ou la tuberculose, et/ou des affections tumorales ou leucémiques et/ou des parasitoses et/ou des maladies d'immunodéficiences telles que le SIDA et/ou des maladies  
10 parasitaires, notamment du paludisme, de l'homme ou de l'animal. L'invention concerne ainsi l'utilisation d'au moins un composé organo-phosphoré selon l'invention pour obtenir une composition pharmaceutique destinée au traitement préventif ou curatif de ces maladies, notamment  
15 par voie générale. Plus particulièrement, la composition pharmaceutique est formulée sous une forme galénique permettant son administration par voie intravasculaire ou intramusculaire, c'est-à-dire directement dans le sang au contact des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  qui doivent être activés.

20 L'invention concerne aussi un procédé pour caractériser un antigène des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains, notamment un composé selon l'invention, caractérisé en ce que :

- l'on vérifie qu'il induit une activation  
25 des lymphocytes,

- l'on vérifie que cette propriété vis-à-vis des lymphocytes disparaît lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une  
30 diester phosphorique phosphohydrolase.

L'invention concerne aussi un procédé pour préparer et/ou isoler et/ou caractériser au moins un composé selon l'invention, caractérisé en ce qu'on soumet une solution aqueuse activant les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains à  
35 au moins une étape de séparation par chromatographie préparative en différentes fractions, et en ce que l'on teste l'activité de chaque fraction sur des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains. Le procédé selon l'invention pour isoler au moins



un composé selon l'invention est caractérisé par les étapes suivantes :

- on cultive une souche d'êtres vivants unicellulaires susceptible d'activer les lymphocytes T<sub>γδ</sub> humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables V<sub>γ9</sub> V<sub>δ2</sub>,

- on réalise un extrait brut de la souche ou on collecte son milieu de culture, et on sépare les composants hydrosolubles de cet extrait ou milieu,

- on sépare une solution aqueuse comprenant ces composants hydrosolubles par chromatographie préparative en différentes fractions susceptibles d'activer des lymphocytes T<sub>γδ</sub> humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables V<sub>γ9</sub> V<sub>δ2</sub>.

Selon l'invention, on cultive une souche de bactéries, notamment de mycobactéries, on effectue une extraction lipidique, et on sépare la phase aqueuse de l'extrait lipidique brut. En particulier, on cultive *Mycobacterium tuberculosis* souche H37Rv ou H37Ra.

En variante, avantageusement et selon l'invention, on cultive une souche de mycobactéries dont la croissance est rapide. Plus particulièrement, on cultive *Mycobacterium fortuitum* biovar *fortuitum* apte à sécréter le (les) composé(s) dans le milieu de culture.

Selon l'invention, l'étape de séparation par chromatographie comprend une séparation anionique par chromatographie échangeuse d'anions avec une solution saline dont on récupère l'éluat salin qui active les lymphocytes T<sub>γδ</sub>. Avantageusement, on prévoit une séparation de la solution saline qui active les lymphocytes T<sub>γδ</sub>, suivie d'un séchage.

Selon l'invention, l'étape de séparation par chromatographie comprend au moins une séparation préparative des différents principes actifs de l'éluat par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluée en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode de suppression chimique, chaque étape de séparation étant

suivie d'une mesure de l'activité des différentes fractions obtenues sur les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ .

Pour caractériser un composé organo-phosphoré selon l'invention, on soumet une solution aqueuse de ce composé à un traitement enzymatique en l'incorporant dans un mélange comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et/ou au moins une diester phosphorique phosphohydrolase, et on mesure l'activité de ce mélange sur des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ . Si la solution aqueuse de départ comprend un composé selon l'invention, on constate une disparition de son activité sur les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ . En outre, selon l'invention, on soumet la solution aqueuse de départ à au moins une analyse chromatographique de ses différents principes actifs par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluée en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode de suppression chimique, chaque étape de séparation étant suivie d'une mesure de l'activité des différentes fractions obtenues sur les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ .

L'invention concerne aussi les composés organo-phosphorés qui peuvent être isolés et/ou caractérisés selon le procédé selon l'invention.

Par ailleurs, l'invention concerne aussi une composition thérapeutique destinée à inhiber la prolifération et/ou la cytotoxicité des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  caractérisée en ce qu'elle contient une proportion pharmaceutiquement acceptable d'au moins un principe présentant une activité enzymatique phosphatase qui est susceptible de cliver au moins un composé activant des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables  $V_{\gamma 9}$  et  $V_{\delta 2}$ . Selon l'invention, la composition comporte une monoester phosphorique phosphohydrolase. En variante ou en combinaison, avantageusement et selon l'invention, la composition comporte au moins une nucléotide pyrophosphatase et/ou au moins une diester phosphorique phosphohydrolase. Selon l'invention, la composition comporte au moins une enzyme

phosphatase alcaline.

Selon l'invention, cette composition est formulée sous une forme galénique permettant son administration directement au contact du milieu incorporant  
5 les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  auto-immunes pathogènes ou au contact d'un milieu susceptible de transporter la composition au contact des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  auto-immunes pathogènes.

Ainsi, la composition selon l'invention est avantageusement formulée sous une forme galénique  
10 permettant son administration par injection dans le sang circulant par exemple, par voie intravasculaire, notamment intraveineuse, ou intramusculaire, ou intradermique, ou autre.

L'invention concerne aussi l'utilisation  
15 d'une composition selon l'invention pour obtenir un médicament inhibant la cytotoxicité des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  impliqués dans au moins une pathologie auto-immune, notamment de la sclérose en plaques. En effet, les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  sont impliqués dans les dégradations  
20 neurologiques de la sclérose en plaques, et la composition selon l'invention vise à inhiber l'activité cytotoxique in situ des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ , c'est-à-dire, leur activité destructrice des cellules du système nerveux central.

D'autres caractéristiques et avantages de  
25 l'invention apparaîtront de la description suivante des exemples et essais, qui se réfère aux figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 est un chromatogramme par perméation de gel d'un extrait mycobactérien incorporant  
30 les composés organo-phosphorés selon l'invention, avec indication des masses moléculaires estimées,

- la figure 2 est un chromatogramme HPLC C18 en paire d'ions obtenu par une étape de séparation chromatographique d'un procédé de préparation des composés  
35 organo-phosphorés selon l'invention,

- la figure 3 est un graphe à points illustrant l'amplification des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  en culture avec un composé organo-phosphoré selon l'invention,

- les figures 4a et 4b illustrent le profil cytofluorimétrique bidimensionnel des lymphocytes T<sub>γ962</sub> en culture respectivement sans et avec un composé organo-phosphoré selon l'invention,
- 5           - la figure 5 est une courbe de titration de l'effet lymphoprolifératif d'un composé organo-phosphoré selon l'invention, pour un clone de lymphocytes T<sub>γ962</sub>.
- la figure 6 est un spectre de résonance magnétique nucléaire <sup>1</sup>H d'un composé organo-phosphoré selon  
10 l'invention,
- la figure 7 est un spectre de masse d'un composé organo-phosphoré selon l'invention,
- la figure 8 illustre trois chromatogrammes superposés HPLC C18 en paire d'ions  
15 respectivement de molécules phosphorylées témoins inactives ; d'un composé organo-phosphoré selon l'invention traité par une monoester phosphohydrolase alcaline ; et une nucléotide pyrophosphatase,
- la figure 9 est un histogramme illustrant  
20 la cytotoxicité induite par un composé organo-phosphoré selon l'invention, sur les lymphocytes T<sub>γ6</sub> en présence d'anticorps monoclonaux de différentes spécificités.

#### PREPARATION DES COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ISOLES :

- 25           Pour préparer les composés organo-phosphorés isolés selon l'invention, on part d'une culture d'une souche d'êtres vivants unicellulaires susceptible d'activer des lymphocytes T<sub>γ6</sub> humains. Plus particulièrement, on part d'une culture de *Mycobacterium tuberculosis* (Institut Pasteur, PARIS - FRANCE) qui active  
30 les lymphocytes T<sub>γ962</sub>. On réalise ensuite un extrait brut de la souche dont on sépare la phase aqueuse. Pour ce faire, on recueille le voile mycobactérien de la culture que l'on traite au chloroforme/méthanol de façon répétée  
35 afin de tuer les bactéries et d'en extraire les substances lipidiques. On réalise une partition des phases aqueuse et organique obtenues.

En variante, on peut aussi partir d'une

culture de souche d'une autre mycobactérie. En particulier, il est avantageux d'utiliser une mycobactérie à croissance rapide et sécrétant les composés recherchés dans le milieu de culture. Par exemple, on peut utiliser *Mycobacterium fortuitum* biovar *fortuitum*. Dans ce cas, il n'est pas  
5 nécessaire de réaliser un extrait brut, et il suffit de collecter le milieu culture dont on sépare les composés hydrosolubles.

La phase aqueuse ainsi obtenue, dénommée  
10 ci-après "extrait ME", contient les composés que l'on sépare par chromatographie préparative en fractions susceptibles d'activer les lymphocytes T<sub>γ962</sub>.

On détermine l'activité des fractions chromatographiques en examinant la prolifération induite  
15 d'un clone de lymphocytes T<sub>γ962</sub> humains actifs sur les mycobactéries de départ (par exemple le clone G115) par la méthode décrite par F. DAVODEAU et al., Journal of Immunology Vol. 151, P 1214 (1993) (test de lymphoprolifération).

20 Les composés sont purifiés de l'extrait ME par une séparation chromatographique échangeuse d'anions, suivie d'une séparation chromatographique de la solution saline par une colonne d'acide silicique, et d'une séparation chromatographique HPLC sur phase inverse C18 en  
25 paires d'ions et/ou d'une séparation chromatographique échangeuse d'anions HPAEC.

Plus précisément, les solutions de l'extrait ME sont passées dans une colonne échangeuse d'anions de type diéthylaminoéthyl (DEAE) dans laquelle les  
30 principes actifs sont élués par des concentrations croissantes de l'acétate d'ammonium. L'activité stimulatrice de chaque éluat est testée sur le clone G115 par le test de lymphoprolifération. Les éluants actifs sur le clone G115 sont traités ensuite dans une colonne  
35 chromatographique d'acide silicique pour les séparer de la solution saline d'acétate d'ammonium. Les éluants successifs utilisés sont l'éthanol 100 %, l'éthanol 90 %, le propanol 2 100 % et le propanol H<sub>2</sub>O (70 % - 30 %). Les

éluats sont séchés et soumis au test de lymphoprolifération. On constate que le dernier éluat est actif, et contient les composés selon l'invention.

Les différents principes actifs de l'éluat  
5 ainsi obtenu sont ensuite soumis à une séparation chromatographique sur une colonne C18 de séparation de la phase hydrophile. Les produits élués en phase aqueuse sont ensuite soumis à une séparation chromatographique HPLC sur une colonne préparative 250/40 C18 telle que BISCHOFF  
10 (marque déposée) ULTRASEP 10µm éluee en paire d'ions avec l'acétate d'ammonium 0,1 M. L'absorption aux différentes longueurs d'ondes est contrôlée par un détecteur d'absorption dans l'ultraviolet. On collecte des fractions chromatographiques toutes les 30 secondes pendant une durée  
15 totale de 40 min.

Le chromatogramme à 260 nm est donné par la courbe en pointillés de la figure 2. La courbe en points blancs illustre l'activité des différentes fractions chromatographiques mesurée par le test de  
20 lymphoprolifération. Cette activité est exprimée en Kcpm (milliers de coups par minute) de la thymidine tritiée incorporée par le clone G115. Par cette séparation chromatographique, on constate la présence de quatre fractions comportant respectivement quatre composés selon  
25 l'invention désignés TUBag1, TUBag2, TUBag3 et TUBag4 dans leur ordre d'élution croissant. Comme on le voit, figure 2, chaque fraction active est de composition hétérogène. Chaque fraction active est individuellement chromatographiée à nouveau par une séparation  
30 chromatographique HPLC conforme à la dernière étape sus-décrite.

Chaque fraction est ensuite soumise à une séparation chromatographique échangeuse d'anions HPAE éluee par un gradient de soude 0,1 M et de méthanol dans l'eau.  
35 Par ailleurs, cette chromatographie permet de mesurer le caractère anionique des différents composés selon l'invention révélé par un détecteur conductimétrique opérant en mode de suppression chimique. Cette séparation

chromatographique permet aussi de contrôler l'homogénéité des composés ainsi purifiés.

Le tableau I fournit les temps de rétention des quatre composés purifiés et de diverses biomolécules  
5 étalons par HPAEC.

TABLEAU I

TEMPS DE RETENTION (RT)  
(exprimés en minutes +/- 0,05 min.)

10	COMPOSE	RT	COMPOSE	RT	COMPOSE	RT
	TUBag1	7,67	Glucose 1P	1,46	TMP5'	7,67
	TUBag2	7,67	Sérine P	6,26	TDP5'Glc	7,67
	TUBag3	14,0	PF	7,13	TDP5'	12,66
	TUBag4	13,0	PEP	7,97	TTP5'	17,27

15 Abréviations : P : phosphate, PF : acide phosphonoformique, PEP : acide phosphoénolpyruvique, TMP5' : thymidine 5' monophosphate, TDP5' : thymidine 5' diphosphate, TDP5' Glc : thymidine 5' diphosphoryl-1 glucose, TTP5' : thymidine 5' triphosphate.

20 Colonne utilisée : échangeuse d'anions sur support pelliculaire modèle AS11 Dionex (marque déposée) 250/4 mm, Eluant utilisé : 2 ml/min composé de la séquence suivante :

- de 0 à 1 min : isocratique 90 % H<sub>2</sub>O + 10 % NaOH (0,1 M),
- de 1 à 12,5 min : gradient atteignant 50 % H<sub>2</sub>O + 50 %  
25 NaOH (0,1 M) à 12,5 min,
- de 12,5 à 22 min : gradient atteignant 5 % H<sub>2</sub>O + 50 % NaOH (0,1 M) + 45 % Méthanol à 22 min,
- de 22 à 23 min : gradient atteignant 90 % H<sub>2</sub>O + 10 % NaOH (0,1 M) à 23 min,
- 30 - de 23 à 28 min : isocratique 90 % H<sub>2</sub>O + 10 % NaOH (0,1 M).

Détecteur utilisé : conductimètre précédé d'un suppresseur ionique à membrane DIONEX (marque déposée).

Comme on le voit, le caractère anionique de  
35 TUBag1 et TUBag2 est analogue à celui de la thymidine 5' monophosphaté (TMP). Egalement, le caractère anionique des antigènes isolés TUBag3 et TUBag4 est plus important que

celui de la thymidine 5' diphosphate, mais moins important que celui de la thymidine 5' triphosphate.

Le caractère anionique des composés antigéniques TUBag1, TUBag2, TUBag3 et TUBag4 est donc  
5 supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate.

#### ANALYSE DE LA STIMULATION DES LYMPHOCYTES $T_{\gamma 9\delta 2}$ PAR LE COMPOSE TUBag4 :

10 On a recueilli les lymphocytes du sang circulant de quatre donneurs humains sains. Ces lymphocytes sont cultivés en présence d'interleukine 2 pendant 10 jours, avec ou sans le composé TUBag4, en quantité saturante. En fin de culture, les nombres de lymphocytes  
15  $Ta\beta$ ,  $T_{\gamma 6}$  ou CD3- (non T) sont comparés dans chacune des deux cultures.

La figure 3 présente le rapport d'amplification, soit le rapport du nombre de cellules en culture avec TUBag4 sur le nombre de cellules en culture  
20 sans TUBag4. Chaque point représente un donneur. Comme on le voit, TUBag4 induit en culture une amplification spécifique polyclonale des lymphocytes  $T_{\gamma 6}$  d'un facteur compris entre 40 et 500 selon les individus.

Les figures 4a et b présentent le phénotype  
25 du récepteur TCR des lymphocytes du sang circulant d'un donneur humain sain cultivés en l'absence (figure 4a) et en présence (figure 4b) de TUBag4. Comme on le voit, TUBag4 induit une amplification massive mais sélective des lymphocytes  $T_{\gamma 9\delta 2}$ .

30 La figure 5 présente la titration de l'effet prolifératif de TUBag4 sur un clone de lymphocytes  $T_{\gamma 9\delta 2}$  (G115) mesuré par le test de lymphoprolifération. Comme on le voit (courbe à points noirs), on a constaté un effet prolifératif de TUBag4 à partir d'une concentration  
35 de l'ordre de 1 ng/ml. La courbe en points blancs traduit l'effet prolifératif en l'absence de TUBag4.

Des résultats analogues obtenus avec TUBag1, TUBag2 et TUBag3 confirment le caractère



antigénique commun de ces composés pour les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ .

#### ANALYSE STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES :

On a tout d'abord soumis la phase aqueuse de l'extrait mycobactérien (ME) mentionnée ci-dessus à deux expériences. Dans la première expérience, le test de lymphoprolifération sur le clone G115 a été conduit sur l'extrait ME seul, sur l'extrait ME en présence de protéinase K (Merck, 6 mU/µg, 2 h à 37° C), et sur l'extrait ME en présence de periodate (10mM de NaHIO<sub>4</sub>, 2 h à 37° C). Dans la seconde expérience, le test a été conduit sur l'extrait ME seul, puis sur l'extrait ME en présence d'enzyme monoester phosphorique phosphohydrolase notamment la phosphatase alcaline. Les lymphoproliférations spécifiques obtenues sont exprimées dans le tableau II suivant, après soustraction de la prolifération spontanée (non stimulée) du clone G115 :

TABLEAU II

	prolifération du clone G 115 (cpm)
<u>Expérience 1</u>	
ME	12 000
ME traité avec protéinase K	12 000
ME traité avec periodate	2 000
<u>Expérience 2</u>	
ME	15 000
ME traité avec phosphatase alcaline	7 000

Ainsi, l'extrait antigénique ME active le clone G115 de lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ . Cet extrait ME est résistant aux protéases, mais son activité sur le clone G115 est inhibée en présence de périodate. L'extrait ME subit donc une dégradation par l'acide périodique. De plus, l'extrait ME est partiellement dégradé sous l'action enzymatique d'une phosphatase alcaline. En conséquence, les antigènes sont hydrosolubles, de nature non-peptidique, mais sont acidolabiles et organo-phosphorés.

A partir de cet extrait ME, on réalise une

séparation chromatographique par filtration de taille avec une colonne permettant la résolution des masses moléculaires comprises entre 400 et 10000, et dans laquelle les principes actifs sont élués par une solution saline d'acétate d'ammonium 0,1 M. Le contenu osidique des fractions recueillies est testé (figure 1, points blancs) par réaction colorimétrique avec l'anthrone sulfurique mesurée à une longueur d'onde de 630 nm. Par ailleurs, l'activité antigénique de chaque fraction obtenue est testée sur le clone G115 (points noirs sur la figure 1) par le test de lymphoprolifération.

Il ressort de la figure 1 que les fractions actives sur les lymphocytes ont toutes un poids moléculaire inférieur à 1000, et qui peut être estimé de l'ordre de 500.

Par ailleurs, l'antigène TUBag4 isolé a été soumis à une analyse structurale par résonance magnétique nucléaire. Le spectre obtenu par l'analyse  $^1\text{H}$  unidimensionnelle (figure 6) démontre la présence des groupes 2-désoxyribose et de la thymine. De plus, des essais de résonance magnétique bidimensionnelle, homonucléaire  $^1\text{H}$   $^1\text{H}$  et hétéronucléaire  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  permettent d'identifier de façon claire la liaison du groupement thymine par son premier azote au carbone anomérique du radical 2-désoxyribose. De surcroît, les résultats permettent de postuler la liaison du cinquième carbone du radical 2-désoxyribose à un groupement phosphoryle.

Par ailleurs, le spectre obtenu par spectrométrie de masse (figure 7) confirme la présence du groupement phosphoryle dans le composé TUBag4. Sur cette figure, on note également la présence de pics pour des valeurs du rapport masse sur charge de 126 et de 155, qui confirment la présence de la thymidine.

Cependant, le test de lymphoprolifération sur le clone G115 effectué avec la thymidine 5' monophosphate, la thymidine 5' diphosphate et la thymidine 5' triphosphate démontre l'inactivité de ces composants sur les lymphocytes. En conséquence, les composés antigéniques

selon l'invention, ne sont pas exclusivement constitués de ces thymidines 5' phosphatées.

Par ailleurs, les quatre composés actifs obtenus par séparation chromatographique ont été soumis à des effets de dégradation enzymatique par des phosphatases. Les enzymes utilisées ont été la monoester phosphorique phosphohydrolase alcaline MP (EC 3.1.3.1), la diester phosphorique phosphohydrolase DP (EC 3.1.4.1) de venin de crotale, et la nucléotide pyrophosphatase NPP (EC 3.6.1.9) de venin de crotale.

L'action de chacun des composés mis au contact respectivement avec chacune de ces enzymes sur le clone G115 est résumée dans le tableau III suivant dans lequel le signe + indique que le composé a conservé une activité alors que le signe - indique la disparition de toute activité à l'égard des lymphocytes.

TABLEAU III

Antigène	Sans traitement	Avec AP	Avec NPP	Avec AP+NPP	Avec DP	Avec AP+DP
TUBag1	+	—	+	—		
TUBag2	+	—	+	—		
TUBag3	+	+	-	—		
TUBag4	+	+	clivage (activité de TUBag1)	—	clivage (activité de TUBag1)	—

Comme on le voit, la monoester phosphorique phosphohydrolase (AP) inactive TUBag1 et TUBag2, mais n'inactive pas TUBag3 et TUBag4. En conséquence, TUBag1 et TUBag2 sont des monoesters phosphoriques.

Par contre, la nucléotide pyrophosphatase (NPP) n'inactive pas TUBag1 et TUBag2, mais inactive TUBag3 et clive TUBag4. En conséquence, la présence d'un noyau nucléotidique est confirmée dans TUBag3 et TUBag4.

L'association d'une monoester phosphorique phosphohydrolase et d'une nucléotide pyrophosphatase sur les antigènes inactive l'intégralité de ces antigènes. Les

mêmes résultats sont obtenus sur TUBag4 en remplaçant la nucléotide pyrophosphatase (NPP) par la diester phosphorique phosphohydrolase (DP) de venin de crotale.

Par ailleurs, l'activité des antigènes en  
5 présence des enzymes a été analysée par chromatographie HPLC sur face inverse C18 en paire d'ions. Les résultats sont illustrés par la figure 8 sur laquelle la courbe supérieure en traits pointillés illustre le profil des thymidines TTP, TDP, TDPGlc et TMP. La courbe médiane  
10 illustre les résultats de la séparation chromatographique de TUBag4 préalablement traité par la monoester phosphorique phosphohydrolase, et la courbe inférieure illustre l'activité de TUBag4 préalablement traité par la nucléotide pyrophosphatase.

15 Comme on le constate sur cette dernière courbe, le composé TUBag4 soumis à l'enzyme nucléotide pyrophosphatase fournit le composé TUBag1.

En conséquence, l'ensemble de ces  
expérimentations démontre que les composés selon  
20 l'invention sont des esters phosphoriques structuralement apparentés.

Par ailleurs, TUBag3 et TUBag4 présentent  
un substituant qui est un groupement nucléosidique  
identifié dans TUBag4 comme la thymidine liée au groupement  
25 phosphoryle dans l'ester par le cinquième carbone de son radical 2-désoxyribose.

Egalement, TUBag1 est le produit de  
l'hydrolyse de TUBag4 par l'action enzymatique d'une  
nucléotide pyrophosphatase ou d'une diester phosphorique  
30 phosphohydrolase.

Ainsi, TUBag1 est un monoester phosphorique  
qui est le produit actif de l'hydrolyse spontanée ou  
enzymatique de TUBag4 ; TUBag2 est un monoester  
phosphorique de caractère anionique analogue à celui de  
35 TUBag1 mais de caractère hydrophobe supérieur ; TUBag3 est  
un diester pyrophosphorique nucléotidique ; et TUBag4 est  
un diester diphosphorique ou triphosphorique de la 5'  
thymidine incorporant TUBag1.

Pour caractériser un composé purifié selon l'invention, il suffit donc de :

- démontrer qu'il induit une activation des lymphocytes  $T_{\gamma 962}$ , par exemple par un test de lymphoprolifération,

- démontrer que cette activité vis-à-vis des lymphocytes  $T_{\gamma 962}$  disparaît soit en présence d'une monoester phosphorique phosphohydrolase (sa structure s'apparente donc à celle de TUBag1 ou de TUBag2), soit en présence d'une part d'une monoester phosphorique phosphohydrolase et, d'autre part, d'une diester phosphorique phosphohydrolase et/ou d'une pyrophosphohydrolase (sa structure s'apparente donc à celle de TUBag3 ou de TUBag4).

Pour identifier précisément la nature du composé, il suffit en outre d'observer son ordre d'élution à la chromatographie HPLC de type C18 éluée en paire d'ions avec l'acétate d'ammonium 0,1 M en le comparant à ceux obtenus avec une solution contenant les composés selon l'invention isolés à partir de l'extrait mycobactérien ME (figure 2), et de déterminer son temps de rétention en chromatographie HPAEC et le comparer au tableau I ci-dessus.

Par ailleurs, si on dispose d'une solution hétérogène incorporant un composé selon l'invention, on peut caractériser la présence de ce composé organophosphoré antigénique en soumettant cette solution aux étapes de séparation chromatographique mentionnées ci-dessus pour l'extrait mycobactérien ME, notamment au moins une séparation préparative des différents principes actifs de l'éluat par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluée en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode de suppression chimique, chaque étape de séparation étant suivie d'une mesure de l'activité des différentes fractions obtenues sur des lymphocytes  $T_{\gamma 6}$ .

CYTOTOXICITE DES LYMPHOCYTES  $T_{\gamma 6}$  EN PRESENCE DES COMPOSES ORGANO-PHOSPHORES ISOLEES :

L'activité cytolytique d'un clone de lymphocytes  $T_{\gamma 62}$  (G115) et d'un clone contrôle de lymphocyte T non  $\gamma 6$  (BH) contre des cellules cibles est mesurée en l'absence ou en présence du composé TUBag4.

Cette activité induite par TUBag4 est déterminée par la formule suivante : (% de lyse spécifique en présence de TUBag4) - (% de lyse spécifique sans TUBag4).

Cette cytotoxicité est estimée à un rapport de cellules tueuses sur cellules cibles de 20 pour 1.

Les résultats sont illustrés par le tableau IV suivant :

15

TABLEAU IV

CELLULES CIBLES			LYSE INDUITE PAR TUBag4	
ORIGINE	NOM	NATURE	G115	BH
Humaine	DAB	BLCL	32	0
	BL70	B Lymphoma	21	0
	BL2195	B Lymphoma	37	3
	RJ225	B Lymphoma	25	0
	RAJI	B Lymphoma	32	0
	BL30195	B Lymphoma	20	0
	BL 30	B Lymphoma	34	5
	KGI	T Lymphoma	16	0
	THPI	T Lymphoma	12	0
	KE6TG	T Lymphoma	26	0
	HSB2	T Lymphoma	21	0
	MRC5	Fibroblast	39	0
Murine	DA2	Inconnue	14	6
	BW5147	Thymoma	12	0
	A20	B Lymphoma	22	0
	SP20	Myeloma	9	0
	P815	Mastocytoma	32	0

Comme on le voit, TUBag4 induit une lyse de toutes les cellules cibles par le clone G115 seulement, mais n'induit pas de lyse par le clone contrôle BH.

40

Cette activité lytique n'est pas spécifique de la cellule cible. Cette activité cytolytique n'est pas non plus restreinte par le complexe MHC. En particulier,

les composés antigéniques selon l'invention activent la cytotoxicité du lymphocyte  $T_{\gamma\delta}$  G115 sur différentes cellules cancéreuses issues de donneurs différents humains ou de souris.

5 De plus, il a été démontré que les composés selon l'invention activent directement l'activité cytotoxique du lymphocyte  $T_{\gamma\delta}$  G115 sans interférer avec la cellule cible.

Cette démonstration a été effectuée par des  
10 essais de pré-incubation dont les résultats indiquent que TUBag4 active directement le clone  $T_{\gamma 962}$ .

Cette interaction directe implique TUBag4 et le TCR  $V_{\gamma 9}$   $V_{\delta 2}$  comme l'indique l'inhibition totale de cette activité cytotoxique lorsque l'expérience est  
15 effectuée en présence d'anticorps monoclonaux dirigés contre le TCR  $V_{\gamma 962}$  (figure 9). Par contre, les anticorps anti-TCR  $V_{\delta 1}$ , HLA DR, HLA DP/DR et HLA 1 n'inhibent pas cette activité cytotoxique. Cela confirme l'absence de restriction par le MHC de cette réponse lymphocytaire.

20 L'efficacité thérapeutique des composés et compositions selon l'invention n'est donc pas limitée par les caractéristiques tissulaires du patient traité, et ce contrairement à la plupart des vaccins connus.

L'invention permet ainsi de stimuler ou  
25 d'inhiber, c'est-à-dire de moduler, la prolifération et/ou la cytotoxicité des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ . A ce titre, on peut donc utiliser un composé organo-phosphoré tel que TUBag1, TUBag2, TUBag3, TUBag4, ou un composé incorporant ces composés organo-phosphorés ou un groupement similaire, pour  
30 obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies de l'homme ou de l'animal dans lesquelles les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  sont impliqués, notamment les maladies infectieuses (en particulier mycobactériennes telles que la lèpre ou la tuberculose) ;  
35 les affections tumorales ou leucémiques de l'homme ou de l'animal ; les parasitoses ; les pathologies immuno-déficiences telles que le SIDA, ...

A l'inverse, on peut aussi inhiber

l'activité des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  in situ en utilisant une enzyme dégradant les antigènes formés des composés organo-phosphorés selon l'invention. Selon l'antigène concerné, on utilise une monoester phosphatase et/ou une diester  
5 phosphatase (y compris une pyrophosphatase telle qu'une nucléotide pyrophosphatase).



## REVENDEICATIONS

1/ - Composé organo-phosphoré hydrosoluble de nature non-peptidique, activateur des lymphocytes T $\gamma\delta$  humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2, ce composé comprenant au moins une liaison ester acidolabile de l'acide phosphorique, le caractère activateur de ce composé vis-à-vis des lymphocytes T $\gamma\delta$  disparaissant lorsqu'il est placé en présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une diester phosphorique phosphohydrolase.

2/ - Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente un caractère anionique mesuré par chromatographie HPAEC à détection conductimétrique en mode de suppression chimique qui est supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate.

3/ - Composé selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisé en ce que, après traitement par une enzyme diester phosphorique phosphohydrolase, il présente un caractère anionique mesuré par chromatographie HPAEC à détection conductimétrique en mode de suppression chimique qui est supérieur à celui de l'acide phosphonoformique et inférieur à celui de la thymidine 5' triphosphate.

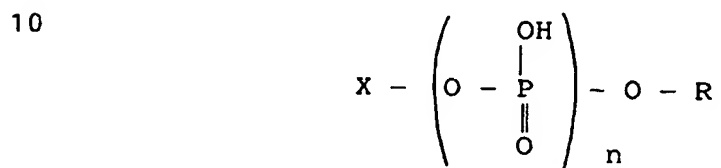
4/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente un caractère hydrophobe mesuré par chromatographie HPLC sur phase inverse de type C18 éluée en paire d'ions avec l'acétate d'ammonium, inférieur à celui de la thymidine 5' monophosphate.

5/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que son effet d'activation sur les lymphocytes T $\gamma\delta$  est inhibé en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques de TCR humains comprenant les régions variables V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2.

6/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un substituant X d'un atome de phosphore de masse moléculaire

inférieure à 500, qui est distinct d'un acide nucléique, d'un oligosaccharide, d'un acide gras, d'un protide, d'un alcaloïde et d'un stéroïde, et qui est lié dans le composé à un groupement phosphoryle par une liaison covalente acidolabile susceptible d'être clivée en présence d'une monoester phosphatase.

7/ - Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



15 où :

R est un hydrogène ou un substituant minéral ou organique, n est un nombre entier non nul.

8/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un groupement nucléosidique.

9/ - Composé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le groupement nucléosidique est la thymidine liée à un groupement phosphoryle par le cinquième carbone de son radical 2-désoxyribose.

10/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un produit de l'hydrolyse d'un composé selon la revendication 9 par l'action enzymatique d'une nucléotide pyrophosphatase et/ou d'une diester phosphorique phosphohydrolase.

11/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un monoester phosphorique acidolabile de masse moléculaire inférieure à 500 distinct de la thymidine 5' monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5' triphosphate.

12/ - Composé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un diester phosphorique acidolabile de masse

moléculaire inférieure à 1 000, distinct de la thymidine 5' monophosphate, de la thymidine 5' diphosphate, de la thymidine 5' diphosphate glucose et de la thymidine 5' triphosphate.

5                            13/ - Composé            selon            l'une            des  
revendications 1 à 12 pour utilisation comme antigène des  
lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains.

14/ - Procédé pour caractériser un antigène  
des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains caractérisé en ce que :

10                            - l'on vérifie qu'il induit une activation  
des lymphocytes,

                             - l'on vérifie que cette propriété vis-à-  
vis des lymphocytes disparaît lorsqu'il est placé en  
présence d'un mélange enzymatique comprenant au moins une  
15 monoester phosphorique phosphohydrolase et au moins une  
diester phosphorique phosphohydrolase.

                             15/ - Procédé pour préparer et/ou isoler  
et/ou caractériser au moins un composé organo-phosphoré  
selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce  
20 qu'on soumet une solution aqueuse activant les lymphocytes  
 $T_{\gamma\delta}$  humains à au moins une étape de séparation par  
chromatographie préparative en différentes fractions, et en  
ce que l'on teste l'activité de chaque fraction sur des  
lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  humains.

25                            16/ - Procédé selon la revendication 15  
pour isoler au moins un composé selon l'une des  
revendications 1 à 13, caractérisé par les étapes  
suivantes :

                             - on cultive une souche d'êtres vivants  
30 unicellulaires susceptible d'activer des lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$   
humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables  
 $V_{\gamma 9}$   $V_{\delta 2}$ ,

                             - on réalise un extrait brut de la souche  
ou on collecte son milieu de culture, dont on sépare les  
35 composants hydrosolubles,

                             - on sépare une solution aqueuse comprenant  
ces composants hydrosolubles par chromatographie  
préparative en différentes fractions susceptibles d'activer

les lymphocytes T $\gamma\delta$  humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables V $\gamma$ 9 V $\delta$ 2.

17/ - Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'on cultive une souche de mycobactéries, on effectue une extraction lipidique, et on sépare la phase aqueuse de l'extrait lipidique brut.

18/ - Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on cultive *Mycobacterium tuberculosis*.

19/ - Procédé selon l'une des revendications 15 et 16, caractérisé en ce qu'on cultive une souche de mycobactéries aptes à sécréter le (les) composé(s) dans le milieu de culture.

20/ - Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'on cultive *Mycobacterium fortuitum* biovar *fortuitum*.

21/ - Procédé selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisé en ce que l'étape de séparation par chromatographie comprend une séparation anionique par chromatographie échangeuse d'anions avec une solution saline dont on récupère l'éluat qui active les lymphocytes T $\gamma\delta$ .

22/ - Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'on effectue ensuite une séparation de la solution saline qui active les lymphocytes T $\gamma\delta$  suivie d'un séchage.

23/ - Procédé selon l'une des revendications 15 à 22, caractérisé en ce que l'étape de séparation par chromatographie comprend au moins une séparation préparative des différents principes actifs de l'éluat par chromatographie HPLC sur phase inverse C18 éluee en paire d'ions et/ou par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC avec détection conductimétrique opérant en mode de suppression chimique, chaque étape de séparation étant suivie d'une mesure de l'activité des différentes fractions obtenues sur des lymphocytes T $\gamma\delta$ .

24/ - Composé activant les lymphocytes humains à récepteurs TCR comprenant les régions variables V $\gamma$  et V $\delta$  -notamment V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2- caractérisé en ce qu'il est

obtenu par un procédé selon l'une des revendications 15 à 23.

25/ - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un composé organo-phosphoré selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24.

26/ - Composition vaccinnante caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un antigène selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24.

27/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24, pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies infectieuses de l'homme ou de l'animal.

28/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies infectieuses mycobactériennes -notamment la lèpre ou la tuberculose- de l'homme ou de l'animal.

29/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des affections tumorales ou leucémiques de l'homme ou de l'animal.

30/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des parasitoses de l'homme ou de l'animal.

31/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des pathologies d'immunodéficiences telles que le SIDA.

32/ - Utilisation d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13 ou 24 pour obtenir une composition pharmaceutique pour le traitement préventif ou curatif des maladies parasitaires, notamment du paludisme.

33/ - Composition thérapeutique caracté-  
risée en ce qu'elle contient une proportion  
pharmaceutiquement acceptable d'au moins un principe  
présentant une activité enzymatique phosphatase susceptible  
5 de dégrader au moins un composé activant des lymphocytes  
T<sub>γ</sub>6 humains à récepteurs TCR comprenant les régions  
variables V<sub>γ</sub>9 et V<sub>δ</sub>2.

34/ - Composition selon la revendication  
33, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une  
10 monoester phosphorique phosphohydrolase.

35/ - Composition selon l'une des  
revendications 33 et 34, caractérisée en ce qu'elle  
comporte au moins une nucléotide pyrophosphatase.

36/ - Composition selon l'une des  
15 revendications 33 à 35, caractérisée en ce qu'elle comporte  
au moins une diester phosphorique phosphohydrolase.

37/ - Composition selon l'une des  
revendications 33 à 36, caractérisée en ce qu'elle comporte  
au moins une enzyme phosphatase alcaline.

38/ - Composition selon l'une des  
20 revendications 25, 26 ou 33 à 37, caractérisée en ce  
qu'elle est formulée sous une forme galénique destinée à  
son administration par injection dans le sang circulant.

39/ - Utilisation d'une composition selon  
25 l'une des revendications 33 à 38 pour obtenir un médicament  
inhibant la cytotoxicité des lymphocytes T<sub>γ</sub>6 impliqués dans  
au moins une pathologie auto-immune.

40/ - Utilisation d'une composition selon  
l'une des revendications 33 à 38 pour obtenir un médicament  
30 destiné au traitement de la sclérose en plaques.

1/4

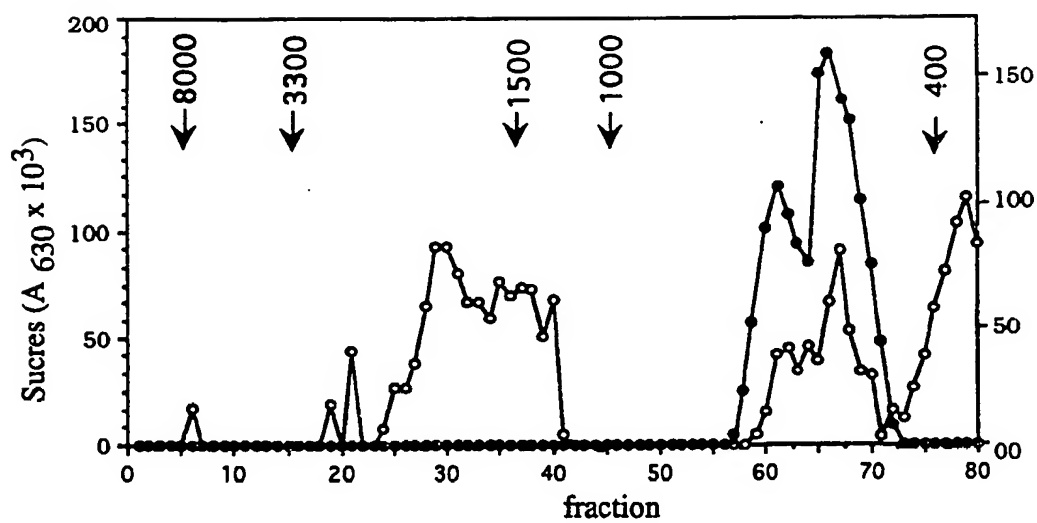


FIG.1

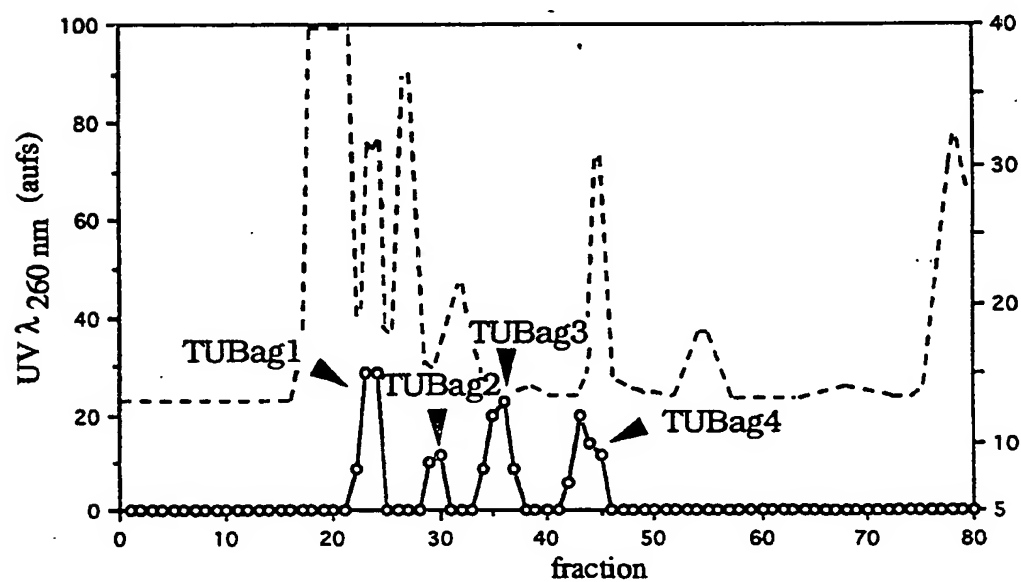


FIG.2

2/4

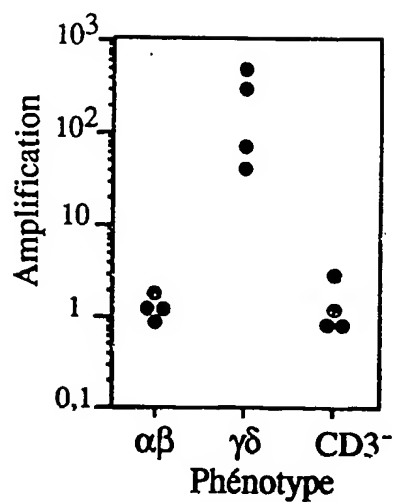
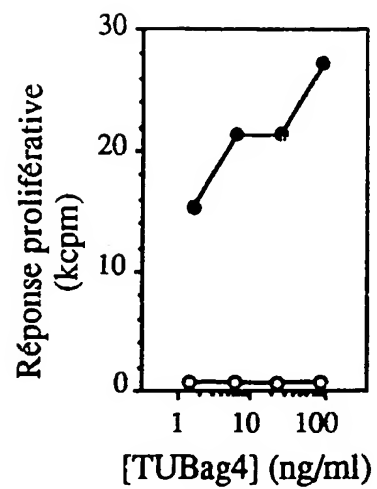
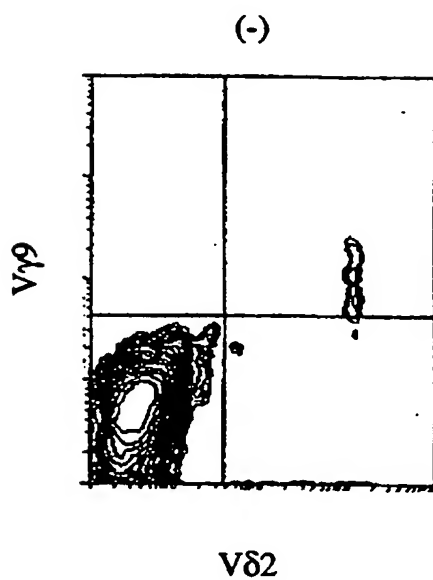
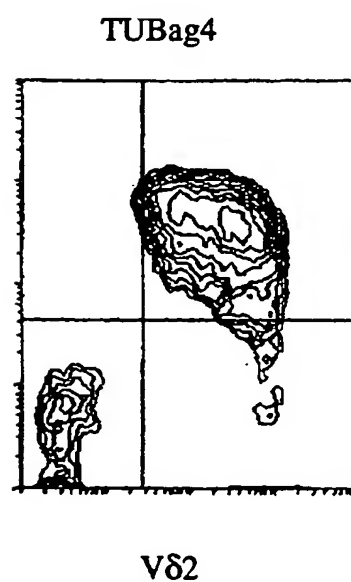
**FIG.3****FIG.5****FIG.4a****FIG.4b**



FIG.6

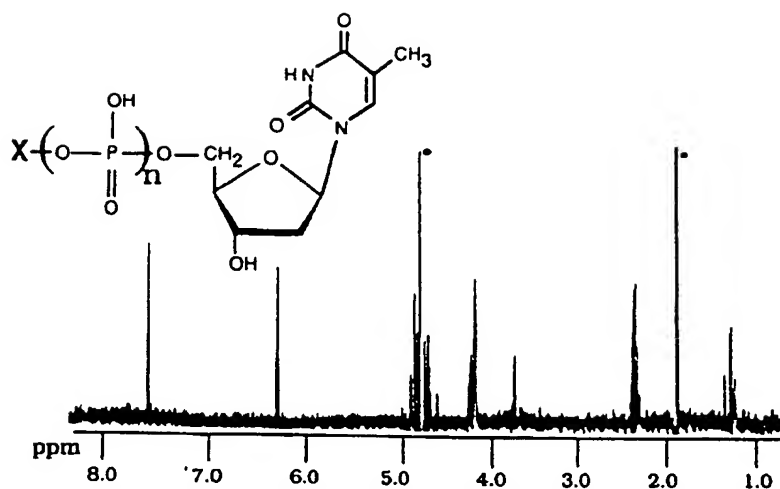


FIG.7

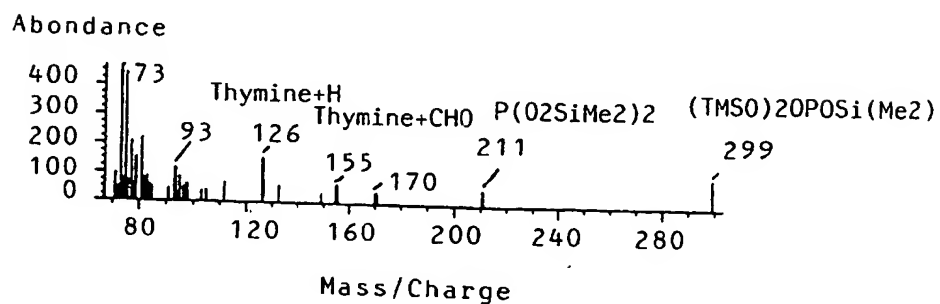
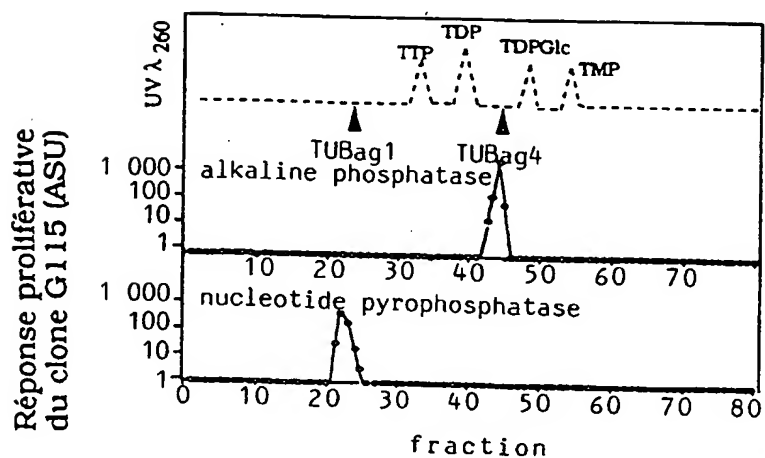


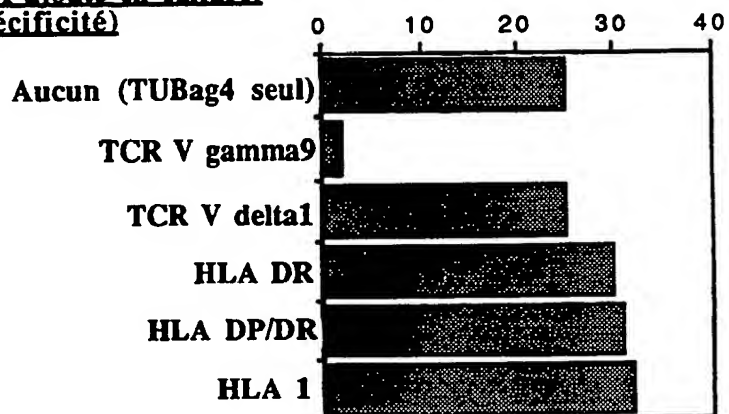
FIG.8



4/4

FIG.9

AcM ajouté en culture: % Cytotoxicité induite par TUBag4:  
(spécificité)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat I Application No  
PCT/FR 95/00092

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12P1/04 C07G17/00 A61K35/74 A61K39/04 A61K38/46  
//(C12P1/04,C12R1:32)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C07G A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.151, no.3, 1 August 1993, BALTIMORE US pages 1214 - 1223 F. DAVODEAU ET AL. 'CLOSE CORRELATION BETWEEN DAUDI AND MYCOBACTERIAL ANTIGEN RECOGNITION BY HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS AND EXPRESSION OF V9JPC1-GAMMA/V2DJC-DELTA ENCODED T CELL RECEPTORS.' cited in the application see the whole document --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
\*E\* earlier document but published on or after the international filing date  
\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 1995

Date of mailing of the international search report

11.05.1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/FR 95/00092

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.148, no.2, 15 January 1992, BALTIMORE US pages 575 - 583 K. PFEFFER ET AL. 'A LECTIN-BINDING, PROTEASE-RESISTANT MYCOBACTERIAL LIGAND SPECIFICALLY ACTIVATES V-GAMMA 9+ HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS.' see the whole document ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 May 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 176581k, D. KABELITZ ET AL. 'A LARGE FRACTION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD GAMMA/DELTA+ T CELLS IS ACTIVATED BY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BUT NOT BY ITS 65-kD HEAT SHOCK PTOTEIN.' page 542 ; see abstract & J. EXP. MED., vol.171, no.3, 1990 pages 667 - 679 ---	1
P,X	SCIENCE, vol.264, 8 April 1994, LANCASTER, PA US pages 267 - 270 P. CONSTANT ET AL. 'STIMULATION OF HUMAN GAMMA DELTA T CELLS BY NONPEPTIDIC MYCOBACTERIAL LIGANDS.' see the whole document -----	1-24

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 95/00092

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C12P1/04 C07G17/00 A61K35/74 A61K39/04 A61K38/46 //(C12P1/04, C12R1:32)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12P C07G A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.151, no.3, 1 Août 1993, BALTIMORE US pages 1214 - 1223 F. DAVODEAU ET AL. 'CLOSE CORRELATION BETWEEN DAUDI AND MYCOBACTERIAL ANTIGEN RECOGNITION BY HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS AND EXPRESSION OF V9JPC1-GAMMA/V2DJC-DELTA ENCODED T CELL RECEPTORS.' cité dans la demande voir le document en entier <div style="text-align: center;">--- -/--</div>	1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center;">26 Avril 1995</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center;">11.05.1995</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center;">Ryckebosch, A</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 95/00092

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol.148, no.2, 15 Janvier 1992, BALTIMORE US pages 575 - 583 K. PFEFFER ET AL. 'A LECTIN-BINDING, PROTEASE-RESISTANT MYCOBACTERIAL LIGAND SPECIFICALLY ACTIVATES V-GAMMA 9+ HUMAN GAMMA-DELTA T CELLS.' voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 Mai 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 176581k, D. KABELITZ ET AL. 'A LARGE FRACTION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD GAMMA/DELTA+ T CELLS IS ACTIVATED BY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BUT NOT BY ITS 65-kD HEAT SHOCK PROTEIN.' page 542 ; voir abrégé &amp; J. EXP. MED., vol.171, no.3, 1990 pages 667 - 679 ---</p>	1
P,X	<p>SCIENCE, vol.264, 8 Avril 1994, LANCASTER, PA US pages 267 - 270 P. CONSTANT ET AL. 'STIMULATION OF HUMAN GAMMA DELTA T CELLS BY NONPEPTIDIC MYCOBACTERIAL LIGANDS.' voir le document en entier -----</p>	1-24